



TITLE:

Structural study on phosphate donor specificity of kinases(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Nagata, Ryuhei

CITATION:

Nagata, Ryuhei. Structural study on phosphate donor specificity of kinases. 京都大学, 2018, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20943>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2018-12-31に公開

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	永 田 隆 平
論文題目	Structural study on phosphate donor specificity of kinases (リン酸化酵素におけるリン酸基供与体特異性に関する構造学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>リン酸化酵素は、リン酸基を供与体から受容体へ受け渡す反応を触媒する．受容体としては様々な化合物が知られているが、供与体としてはもっぱらATPが用いられる．そのため、リン酸化酵素を工業的な物質生産に利用する際、ATPにかかるコストが障害になる．一方、ATPの代わりにピロリン酸（PPi）を供与体として用いる酵素も存在する．PPiはATPの1000分の1の価格であるため、PPi依存性リン酸化酵素は物質生産への応用が期待できる．しかし、このような酵素は三種類しか同定されておらず、そのPPi認識機構も不明である．本研究では、ATP依存性リン酸化酵素とそのホモログとして見つかった新規PPi依存性リン酸化酵素の基質複合体の結晶構造解析を行い、PPi依存性酵素がPPiを特異的に利用する分子機構を明らかにした．また、特定したPPi特異的認識に関わる残基を指標にして、ゲノム配列データベースから新たなPPi依存性リン酸化酵素を見い出した．</p> <p>ATP依存性リン酸化酵素としては、ATP依存性イノシトールリン酸化酵素（ATP-InsK）を対象にした．この酵素は、イノシトールの六つのヒドロキシル基の一つをリン酸化するが、リン酸化される箇所は不明であり、イノシトール認識機構も未解明である．これらを明らかにするために、ATP-InsKの基質結合型構造を決定した．この構造では、五つの残基がイノシトールの六つのヒドロキシル基全てを認識していた．このうち、Q136はイノシトールだけでなく、反応に必須なマグネシウムイオンとも相互作用していた．そこで変異体解析を行い、Q136は金属イオンの結合には必須でなく、イノシトールの結合に重要であることを確かめた．また、基質結合型構造ではイノシトールの3位のヒドロキシル基が、他の五つよりもATP類似体のγリン酸や触媒残基と近いことから、ここがリン酸化されるヒドロキシル基であると予想された．この3位がリン酸化されることは、生成物複合体構造およびNMRやキラルカラムを用いたHPLCによる生成物分析で実際に確かめられた．生成物の特定により、ATP-InsKの代謝中での役割が示唆された．</p> <p>未同定のイノシトールリン酸化酵素を見つける目的で、ATP-InsKと立体構造が類似している酵素を検索したところ、ATP-InsKのイノシトール認識残基を有するが、供与体結合部位は大きな残基（F221, R232, M266）で塞がれている酵素が見</p>			

つかった．この酵素はATP依存的なリン酸化活性を持たないと報告されていた．酵素活性を調べた結果，本酵素がATPやADPでなくPPiを特異的に利用してイノシトールをリン酸化することを見出した．次に，本酵素PPi-InsKの基質結合型構造と硫酸イオン結合型構造を決定し，これらの構造と変異体解析から，PPi認識に関わる残基を特定した．特に，K171，R229，R232は，PPi-InsKと同じ酵素群に属するATPあるいはADP依存性酵素には存在しない特徴的な残基であった．この三つの残基とATP結合部位を塞ぐ残基を合わせた5残基（R229は両方に関わる）をPPi特異的な認識の鍵となる残基であると考えた．そこで，新たなPPi依存性酵素を見つけるために，ゲノム配列データベースを探索し，鍵となる五つの残基を持つ酵素を50個発見した．そのうちの二つは，実際にPPi特異的なリン酸化活性を示すことを確認した．二つの酵素はバクテリアと真核生物由来であり，PPi-InsKと同じ酵素群のPPi依存性酵素は，限られた種だけでなく自然界に広く存在すると考えられる．

(論文審査の結果の要旨)

リン酸化酵素は、リン酸基の受け渡しを担う転移酵素である。リン酸基受容体としては様々な化合物が知られている一方、供与体にはほとんどの場合ATPが用いられる。ピロリン酸 (PPi) がATPに比べて極めて安価で、物質生産への応用が期待できることから、本研究では、ATPの代わりにピロリン酸 (PPi) を供与体として用いることができるPPi依存性リン酸化酵素に注目している。しかしながら、PPi依存性酵素の存在はあまり知られておらず、PPi認識機構もよく分かっていない。本論文は、ATP依存性イノシトールリン酸化酵素 (ATP-InsK) とそのホモログとして新たに見出されたPPi依存性酵素 (PPi-InsK) の基質複合体の結晶構造を決定し、PPi依存性酵素がPPiを特異的に利用する仕組みを明らかにしようとしたものである。また、明らかになったPPi特異的認識の鍵となる残基を指標として、新たなPPi依存性酵素を検索している。

まず、ATP-InsKのイノシトールとATP類似体との複合体構造を決定している。この構造と変異体解析から、イノシトールの結合に関わる五つの残基を特定している。また、複合体構造から、イノシトールの六つのヒドロキシル基でリン酸化される箇所を予測し、その仮説を生成物複合体構造や生成物の分析によって実際に確かめている。これらの結果はイノシトールリン酸化酵素におけるイノシトール認識様式を初めて明らかにしたものであり、イノシトールのリン酸化位置を特定することによって、ATP-InsKの生体内での役割を示唆している。

次に、ATP-InsKのホモログとして、ATPやADPでなく、PPiを供与体に用いてイノシトールをリン酸化する新規酵素PPi-InsKを見出している。この酵素の基質非結合型構造とATP-InsKの基質結合型構造の比較から、PPi-InsKにおいてATP結合部位の一部を塞ぐ三つの残基を特定している。また、PPi-InsKの基質結合型構造を含む複数の結晶構造を決定し、PPi-InsKのPPi認識残基を明らかにしている。さらに、同じ酵素群のATPやADP依存性の酵素との比較から、PPi認識残基のうちPPi-InsKに特徴的な三つの残基を見出し、ATP結合部位を塞ぐ残基と合わせた5残基がPPi特異的認識に重要であることを提唱している。この5残基を指標にして、実際にゲノム配列データベースから、PPiを特異的に利用するリン酸化酵素を見つけることに成功している。

以上のことから、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。